



TITLE:

蛇毒のアルカリ性ホスファターゼ
類の研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

岩永, 貞昭

CITATION:

岩永, 貞昭. 蛇毒のアルカリ性ホスファターゼ類の研究. 京都大学, 1961,
薬学博士

ISSUE DATE:

1961-09-26

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/210806>

RIGHT:

氏 名	岩 永 貞 昭 いわ なが さだ あき
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	薬 博 第 1 9 号
学位授与の日付	昭和 36 年 9 月 26 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専 攻	薬 学 研 究 科 薬 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	蛇毒のアルカリ性ホスファターゼ類の研究
	(主 査)
論文調査委員	教 授 鈴 木 友 二 教 授 井 上 博 之 教 授 富 田 真 雄

論 文 内 容 の 要 旨

蛇毒のもつ諸酵素は核酸やアミノ酸の代謝の研究に必須なものとして生化学の研究面からも注目されている。とくにホスホジエステラーゼをはじめとする蛇毒のアルカリ性ホスファターゼ類は、近年核酸の構造研究の進展と相まってその利用も広まりつつある。そのため高純度で性状の精査された酵素標品が要望され、諸酵素の分離、精製の研究が必須となったが、これまで日本産、台湾産蛇毒についてのこの種の研究はほとんど皆無であった。著者は日本産のマムシ毒を中心に台湾産蛇毒も加えて、蛇毒のアルカリ性ホスファターゼ類の研究に着手した。

研究の方針としてアルカリ性ホスファターゼ類の性状を調べることからはじめ、それからえた知見にもとづいて目的とする酵素以外の諸酵素をも犠牲にすることのないような精製法を検討した。特に核酸分解酵素の一つとして注目されているホスホジエステラーゼの精製法に最も主力をおいて、主として吸着クロマトグラフィーによる新しい方法を考案した。さらにまた最近蛋白質の分画にかなりの成功を収めたイオン交換セルローズを利用しつつ、アルカリ性ホスファターゼ類のみでなく蛇毒酵素一般に使える分離法を確立した。その間に著者は蛇毒中に2種あるいはそれ以上のホスホジエステラーゼを見いだしてその基質特異性を調べ、また従来蛇毒で知られていたホスホジエステラーゼとは別の核酸分解酵素の存在を明らかにし、その性状に若干の知見を加えた。以下研究結果の概略を述べる。

1) 蛇毒のアルカリ性ホスファターゼ類の活性を測定する条件について検討を加え、粗毒を透析処理して金属イオンを除き、かつ反応時の緩衝液をかえつつ測定法の感度をあげた。それらの研究によって、従来蛇毒中に存在しないとされていたグリセロホスファターゼやホスホモノエステラーゼなどを日本産、台湾産のほとんどの蛇毒で見だし、粗毒中では Zn^{++} がこれら酵素の活性を著しく阻害していることを知った。またホスホモノエステラーゼ、グリセロホスファターゼはともにモノエステラーゼに属するが、両者には至適 pH (前者8.5, 後者10.5), 至適温度 (前者60°, 後者35°), 熱, pH に対する安定度も差があることを明らかにし CM-セルローズで両者を分画した。またモノエステラーゼが従来蛇毒ホスファター

ぜでは分解されないと言われている 3'-ヌクレオチドを長時間の作用によってではあるが、水解することもわかった。なおいずれのホスファターゼ活性もコブラ科の蛇毒において強いが、また日本産のマムシなどもホスホジエステラーゼの酵素源として充分利用できる。

2) Sinsheimer らが *Crotalus* 属の蛇に用いたアセトン分別法に多少の改良を加えてマムシ毒のホスホジエステラーゼを比較的簡単な操作で分離した。しかし収量は 8% 程度で、比活性の上昇やほかの酵素の活用もこの方法ではほとんど望めなかったので、分離法を検討し、濾紙燐酸カルシウムゲルの吸着クロマトグラフィーによる新しい精製法を考案した。この方法でえたホスホジエステラーゼ標品は 5'-ヌクレオチダーゼをほとんど含まず、平均して純度の上昇は 15~25 倍、収量は 10~34% 程度である。このクロマトグラフィーによると同時に別の画分に L-アミノ酸酸化酵素、レシチナーゼなどを完全に集めえる。また台湾コブラ毒はマムシ毒と異なりアルミナ Cγ ゲル、燐酸カルシウムゲルのほかカチオン交換剤にもよく吸着されることを知り、さきの濾紙燐酸カルシウムゲルのクロマトグラフィーに CM-セルローズのカラムクロマトグラフィーを組み合わせ、モノエステラーゼや 5'-ヌクレオチダーゼを含め高純度のホスホジエステラーゼをえた。また CM-セルローズのカラムクロマトグラフィーを検討し、酢酸緩衝液の濃度を連続的にかえる溶出法によってグリセロホスファターゼ、ホスホジエステラーゼ、5'-ヌクレオチダーゼなどコブラ毒中のほとんどの酵素の分画に成功した。

3) コブラ毒のカラムクロマトグラフィーを検討中著者はクロマトグラフの上で 2 種のホスホジエステラーゼを見いだした。このことはさらにハブ毒で 2 種、青ハブ毒で 2 種、マムシ毒で 3 種と蛇毒の種類をかえても、またきわめて新鮮な蛇毒を材料としても認められたので、これらホスホジエステラーゼの諸性質、とくに基質特異性について調べた。そのため DEAE-セルローズと CM-セルローズの組み合わせたカラムクロマトグラフィーでマムシ毒から 3 種のジエステラーゼ (ジエステラーゼ I, II, III) を分画し、高分子 RNA と合成基質に対する活性比を求めた結果、その値は各ジエステラーゼでかなり異なっていた。DNA-オリゴヌクレオチドや DPN などを基質に加えて水解力を比較した結果、i) ジエステラーゼ I は DNA-オリゴヌクレオチド、DPN、合成基質に対してジエステラーゼ II と III の約 4 倍の活性をもつが、RNA に対しては約 70% 水解すると反応がとまってしまうこと、ii) ジエステラーゼ III は DNA-オリゴヌクレオチド、DPN、合成基質に対する活性は弱い、RNA を完全に水解すること、iii) Mg^{++} によってジエステラーゼ II と III は活性化されるが、ジエステラーゼ I は影響されないなどの知見をえた。これら基質特異性の研究の過程で従来ヌクレオチドピロホスファターゼとして報告されているものは、蛇毒ではホスホジエステラーゼそのものに外ならないことを明らかにした。さらにまた環状ヌクレオチドの分解をこれら 3 種のジエステラーゼについて試み、分解に長時間を要するがジエステラーゼ I の活性がもっとも強く、かつこの標品中には環状 3',5'-アデニル酸の 3' 位で切断するもののほか、5' 位で切る酵素もわずかに含まれていることを認めた。ジエステラーゼ II と III は環状 3',5'-アデニル酸の 3' 位の結合にのみ作用する。

論文審査の結果の要旨

著者は日本産、台湾産蛇毒のアルカリ性ホスファターゼを分離精製し、その性質を精査した。ことに核糖の構造研究に必須とされているホスホジエステラーゼに研究の中心をおいたが、精製によってこの酵素が三つに分かれることを知り、その各々についての性状を明らかにした。この研究によって従来核酸を

蛇毒のホスフォジエステラーゼで水解したときの異状の現象，すなわち予期以上のヌクレオシドジ磷酸を生ずることがよく説明できるようになった。また著者は従来 DPN-ピロホスファターゼとして報告されていた酵素は蛇毒ではホスフォジエステラーゼそのものにほかならないことを明らかにした。さらにまた従来ある種の蛇毒でだけその存在が報告され，一般には存在しないとされていたグリセロホスファターゼ，ホスフォモノエステラーゼはどの蛇毒にも存在することを知った。蛇毒中には Zn^{++} がかなりあってこの Zn^{++} が両酵素の活性を強く阻害するために，その活性がみおとされてきたのである。

その他著者が分離した諸酵素の応用についても研究した。本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認定する。